

Mgr Magdalena Grzeszczuk
Zakład Genetyki Bakterii
Instytut Mikrobiologii
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski

AUTOREFERAT ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Thiol-oxidoreductases of *Helicobacter pylori* – analysis of their interactions with substrates and redox partners

Promotor: Prof. dr hab. Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka

Recenzenci: Dr hab. Anna Pawlik

Laboratorium Biologii Molekularnej Mikroorganizmów

Zakład Mikrobiologii

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii
Nauk, Wrocław

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

Pracownia Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium*

Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk, Łódź

Bakteryjne białka rodziny Dsb (*disulfide bond*) odpowiedzialne są za wprowadzanie mostków disiarczkowych do białek pozacytoplazmatycznych będących często istotnymi czynnikami wirulencji bakterii patogennych. Proces oksydacyjnego fałdowania białek decyduje o ich strukturze przestrzennej, a więc w konsekwencji o ich aktywności. Najdokładniej, jak dotąd, scharakteryzowano funkcjonowanie systemu Dsb w komórkach *Escherichia coli*, gdzie w przestrzeni peryplazmatycznej aktywne są dwa szlaki metaboliczne: szlak utleniania (katalizowany przez EcDsbA i EcDsbB) oraz szlak izomeryzacji/redukcji (katalizowany przez EcDsbC i EcDsbD). Nie wszystkie białka wymagają wprowadzenia mostków disiarczkowych – niektóre wręcz przeciwnie, w ściśle utleniających warunkach peryplazmy muszą pozostać w formie zredukowanej (grupy –SH cystein niepołączone wiązaniem disiarczkowym). Dotyczy to między innymi apocytochromu c. Dojrzewanie apocytochromu wymaga ligacji hemu do zredukowanego motywu CXXCH apocytochromu. Za

proces redukcji apocytochromu odpowiedzialne są w komórkach bakteryjnych monomeryczne białka rodziny Dsb, określane jako CcmG (*cytochrome c maturation*), których jedynym znanym substratem jest apocytochrom. System Dsb *Helicobacter pylori* w porównaniu do innych bakterii jest bardzo ubogi. *H. pylori* nie koduje klasycznych białek szlaku utleniania DsbA/DsbB oraz szlaku izomeryzacji redukcji: DsbC/DsbD. Posiada natomiast dwa białka pozacytoplazmatyczne (HP0231 i HP0377) posiadające domenę tioredoksynową z motywem CXXC co jest cechą charakterystyczną dla białek z rodziny Dsb. Białko HP0231 jest dimeryczną oksydoreduktazą kluczową w procesie formowania mostków disiarczkowych. Posiada aktywność oksydacyjną pomimo swojego podobieństwa strukturalnego do EcDsbG – dimerycznego białka chroniącego reszty cysteinowe przed utlenieniem do kwasów sulfenowych. Badania przeprowadzone w Zakładzie Genetyki Bakterii wykazały również, że HP0231 posiada także aktywność chaperonową. Białko HP0231 jest więc nietypową dimeryczną oksydoreduktazą łączącą w sobie aktywności białek DsbA i DsbG, nie posiadającą przy tym aktywności izomeryzacyjnej. Dlatego też zostało nazwane białkiem DsbK. Za jego reutlenienie jest częściowo odpowiedzialne błonowe białko HP0595 (DsbI). Białko HP0377 początkowo opisywane jako homolog EcDsbC przypomina strukturą białka z rodziny CcmG oraz posiada zdolność do redukcji apocytochromu *in vitro*.

W pierwszej części pracy dokonano charakterystyki biochemicznej, strukturalnej i funkcjonalnej HP0377. Na początku zmierzono wartość pK_a dla obu cystein jego motywu CXXC. Wartość pK_a cysteiny pozwala określić w jakim pH cysteina występuje w równowadze w formie uprotonowanej i w formie anionu tiolowego. Oksydoreduktazy są aktywne w reakcjach wprowadzania mostków disiarczkowych, gdy pierwsza cysteina motywu CXXC występuje w formie anionu tiolowego. Wykazano, że HP0377 jest pierwszym opisanym białkiem CcmG posiadającym wyjątkowo niskie pK_a ($3,46 \pm 0,24$), zbliżone do wartości pK_a głównej oksydazy *Escherichia coli* DsbA (3,5) i izomerazy EcDsbC (4,1). Przeprowadzone następnie testy aktywności izomeryzacyjnej i oksydacyjnej *in vitro* wykazały, że badana oksydoreduktaza w przeciwieństwie do innych białek CcmG, które są zaangażowane wyłącznie w proces biogenezy cytochromu, jest białkiem wielofunkcyjnym. Wykazuje ona wysoką aktywność izomeryzacyjną, a pozbawiona jest aktywności oksydacyjnej. Wszystkie znane białka Dsb będące izomerazami występują w formach dimerycznych. Przeprowadzona reakcja sieciowania chemicznego z wykorzystaniem aldehydu glutarowego i sączenie molekularne wykazały, że HP0377 także tworzy dimery i występuje w równowadze

termodynamicznej między formą monomeryczną i dimeryczną. Fakt ten zainspirował do analizy struktury kompleksu HP0377 z jego substratem (apocytochromem c). W tym teście wykorzystano zmutowaną wersję HP0377. Wprowadzona mutacja (zamiana C-końcowej cysteiny motywu CXXC na alaninę) uniemożliwia rozpad kompleksu białko-substrat. Analiza SDS-PAGE i sączenie molekularne wykazały, że białko w formie dimerycznej łączy się z jedną cząsteczką apocytochromu. Kolejnym etapem badań było zidentyfikowanie partnera redoks (czyli białka odpowiedzialnego za utrzymywanie HP0377 w jego aktywnej, zredukowanej formie). W proteomie *H. pylori* występuje białko HP0265, które opisywane jest jako białko CcdA (skrótowa forma DsbD). Porównanie stanu redoks HP0377 w komórkach typu dzikiego i mutantu w genie kodującym HP0265 pokazały, że HP0377 w szczepie z unieczynnionym genem *hp0265* występuje w stanie utlenionym a w szczepie typu dzikiego w formie zredukowanej.

Ponieważ unieczynnienie genu *hp0377* *H. pylori* jest letalne dla komórki, przeprowadzono badania mające na celu funkcjonalną charakterystykę HP0377 w heterologicznym gospodarzu *Bacillus subtilis*. Wykonanie eksperymentów w komórkach *E. coli*, organizmu modelowego do badań szlaków Dsb, było niemożliwe ze względu na znaczące różnice w szlakach dojrzewania cytochromu pomiędzy bakteriami gatunku *H. pylori* i *E. coli*. Szlak dojrzewania cytochromu *B. subtilis* jest identyczny jak w komórkach *H. pylori*. Dodatkowo analizy bioinformatyczne i strukturalne wykazały duże podobieństwo HP0377 do ResA – homologa CcmG *Bacillus subtilis*. Analiza obecności aktywnych cytochromów wykazała, że HP0377 zastępuje brak ResA, co stanowiło pierwszy dowód świadczący o jego zdolności do redukcji apocytochromu w warunkach *in vivo* (wcześniejsze wnioski oparte były na wynikach doświadczeń *in vitro*).

Ostatnim etapem tej części pracy była analiza aktywności wybranych mutantów punktowych białka HP0377 w testach *in vivo* i *in vitro*. Badania wykazały, że białko HP0377 ze zmienionymi pojedynczymi cysteinami na seryny w motywie katalitycznym CSYC nie traci aktywności *in vitro* i *in vivo*, natomiast w przypadku zamiany pojedynczych cystein na alaniny białko staje się nieaktywne. Zamiana obydwu cystein na seryny/alaniny również powodowała utratę aktywności. Zamiana treoniny poprzedzającej prolinę w pętli *cis*-prolinowej (TcP) nie wpływała na aktywność w testach *in vitro*, natomiast zamiana TcP na TcT wpływała negatywnie na aktywność białka *in vivo*. Ponieważ podobnej obserwacji nie

zauważano w przypadku testów *in vitro*, sprawdzono wpływ mutacji na oddziaływanie z partnerem redoks. Okazało się, że białko HP0377_{TCT} występuje w formie utlenionej w komórkach *B. subtilis* w przeciwieństwie do dzikiej wersji białka, co świadczy o udziale *cis*-proliny w oddziaływaniu z partnerem redoks.

W drugiej części pracy przeprowadzono analizę wpływu badanego systemu Dsb na proces oksydacyjnego fałdowania białka HopQ (*Helicobacter outer protein*). Analizy *in silico* wykazały obecność w niektórych sekwencjach aminokwasowych białek błony zewnętrznej *H. pylori* parzystej liczby reszt cysteinowych, co wskazuje, że mogą być one celem działania białek systemu Dsb. Wstępne eksperymenty wpływu białek Dsb na proces oddziaływania *H. pylori* z komórkami AGS (nabłonkowe komórki nowotworu żołądka) udokumentowały, że z trzech analizowanych mutantów ($\Delta hp0231$, $\Delta hp0377$, $\Delta hp0595$) tylko szczep *H. pylori* $\Delta hp0231$ nie jest zdolny do indukcji zmian fizjologii komórek eukariotycznych. Ponadto uprzednio wykazano, że w subproteomie peryplazmatycznym szczepu zmutowanego w genie *hp0231* występuje znacząco podwyższona ilość dwóch białek błony zewnętrznej HopQ i HopD. Do dalszych eksperymentów mających na celu poznanie szczegółów oksydacyjnego fałdowania białek błony zewnętrznej wytypowano białko HopQ, w którego sekwencji aminokwasowej występuje sześć reszt cysteinowych tworzących trzy mostki disiarczkowe. Wiadomo, że HopQ odgrywa istotną rolę w procesach patogenezy, wpływa na proces transportu białka CagA *H. pylori* (główna onkoproteina patogenu) do komórek gospodarza przez IV system sekrecji poprzez oddziaływanie z receptorami CEACAM1. Przeprowadzona w ZGB identyfikacja substratów HP0231 metodą „reverse purification” wykazała, że wśród otrzymanej puli białek występuje białko HopQ (oraz 6 innych białek Hop). Badania prezentowane w publikacji włączonej do rozprawy doktorskiej wykazały, że HopQ w szczepie z unieczynnionym genem *hp0231* występuje w stanie zredukowanym (w szczepie dzikim w formie utlenionej) i lokalizuje się głównie w peryplazmie (w szczepie dzikim w błonie zewnętrznej). Oba wyniki dokumentują, że HP0231 warunkuje nie tylko stan redoks ale i poprawną lokalizację HopQ. HopQ pozbawione mostków disiarczkowych (mutageneza specyficzna co do miejsca) nie jest w stanie oddziaływać z obecnymi na powierzchni komórek AGS receptorami CEACAM1 a szczep *H. pylori* produkujący zmutowane HopQ nie wpływa na szlaki sygnalizacyjne komórek eukariotycznych AGS. Tylko dwa z trzech mostków disiarczkowych HopQ są niezbędne do jego prawidłowego działania.

Podsumowując, w prezentowanej rozprawie udokumentowano, że HP0377 jest nietypową oksydoreduktazą Dsb łączącą w sobie aktywność białka CcmG i DsbC. Występuje ono w równowadze pomiędzy formą dimeryczną i monomeryczną i jako dimer oddziałuje ze swoim substratem - apocytochromem. Za utrzymywane białka HP0377 w jego aktywnej, zredukowanej formie odpowiedzialne jest HP0265 będące białkiem rodziny CcdA, które jest skróconą formą białka DsbD. Za prawidłowe oddziaływanie białka HP0377 z partnerem redoks odpowiada prolina znajdująca się w pętli *cis*-prolinowej. Identyfikacja substratów HP0231 (badania ZGB) udowodniła, że białka błony zewnętrznej należące do rodziny Hop są substratami białek Dsb. Na przykładzie białka HopQ wykazano, że mostki disiarczkowe występujące w białkach błony zewnętrznej mogą odpowiadać za ich poprawną lokalizację i pełnioną funkcję.